

**AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR, DAN NON  
POLAR EKSTRAK ETANOL DAUN TUMBUHAN SALA (*Cynometra  
ramiflora* Linn.) TERHADAP SEL T47D**

**NASKAH PUBLIKASI**



**Oleh:**

**ITSNA FAJARWATI  
K100 100 031**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2014**

**PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI**

**Berjudul:**

**AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR,  
DAN NON POLAR EKSTRAK ETANOL DAUN TUMBUHAN  
SALA (*Cynometra ramiflora* Linn.) TERHADAP SEL T47D**

Oleh:  
**ITSNA FAJARWATI**  
**K100 100 031**

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Pada tanggal: 18 Februari 2014**

**Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Dekan,**

**Azis Saifudin, Ph.D., Apt.**

**Penguji :**

1. Azis Saifudin, Ph.D., Apt.
2. Rima Munawaroh, M.Sc., Apt.
3. Dr. Haryoto, M.Sc.
4. Andi Suhendi, S.Farm., Apt.

  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

**AKTIVITAS SITOTOKSIK FRAKSI POLAR, SEMIPOLAR, DAN NON POLAR  
EKSTRAK ETANOL DAUN TUMBUHAN SALA (*Cynometra ramiflora* Linn.)  
TERHADAP SEL T47D**

**CYTOTOXIC ACTIVITY OF POLAR, SEMIPOLAR, AND NON POLAR FRACTION  
OF ETHANOL EXTRACT OF SALA LEAVES (*Cynometra ramiflora* Linn.) AGAINST  
T47D CELL**

**Itsna Fajarwati, Haryoto, Andi Suhendi**

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta,  
Jl A Yani Tromol Pos I, Pabelan Kartasura Surakarta 57102

**ABSTRAK**

Tumbuhan sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) diketahui memiliki aktifitas antikanker. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas sitotoksik fraksi polar, semipolar, dan non polar ekstrak etanol daun *Cynometra ramiflora* Linn. terhadap sel T47D. Fraksinasi terhadap ekstrak etanol daun tumbuhan sala melalui metode KCV dengan fase diam silica G60. Kombinasi n-heksan dan etil asetat sebagai fase gerak tipe gradien dengan perbandingan (8:2), (7,5:2,5), (7:3), (6:4), dan (3:7) dan etanol 96%. Kandungan senyawa dalam fraksi diidentifikasi menggunakan KLT dengan berbagai pereaksi semprot. Uji sitotoksik secara *in vitro* dilakukan dengan metode kolorimetri dengan reagen MTT. Aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D tertinggi ditunjukkan oleh fraksi polar dengan  $IC_{50}$  sebesar 260,0171  $\mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50}$  fraksi non polar sebesar 294,7592  $\mu\text{g/mL}$ , dan aktivitas terendah ditunjukkan oleh fraksi semipolar dengan  $IC_{50}$  318,6368  $\mu\text{g/mL}$ . Senyawa hasil identifikasi dalam fraksi polar adalah flavonoid, fenolik dan alkaloid. Fraksi semipolar mengandung fenolik dan alkaloid. Sedangkan fraksi non polar mengandung senyawa alkaloid dan fenolik. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa fraksi polar, semipolar, dan non polar ekstrak etanol daun tumbuhan sala memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.

**Kata kunci:** Uji sitotoksik, Sel T47D, *Cynometra ramiflora*, fraksi

**ABSTRACT**

*Plant sala (Cynometra ramiflora Linn.) known to have anticancer activity. Therefore, in this study tested the cytotoxic activity polar, semipolar, and non polar fraction of ethanol extract of leaves Cynometra ramiflora Linn. against T47D cells. Fractionation of the ethanol extract the sala leaves through VLC (Vacuum Liquid Chromatography) method with silica G60 as the stationary phase. The combination of n-hexane and ethyl acetate as gradient-type mobile phase with comparison of (8:2), (7,5:2,5), (7:3), (6:4), and (3:7) and ethanol 96%. The content of the compounds in the fractions was identified using the TLC with various spray reagents. In vitro cytotoxic assay was conducted using the colorimetric MTT reagent. The highest cytotoxic activity against T47D cells indicated by polar fraction with  $IC_{50}$  of 260.0171 g/mL,  $IC_{50}$  non -polar fraction of 294.7592 g/mL, and the lowest activity was shown by the semipolar fraction with  $IC_{50}$  318.6368 mg/mL. Compound that identify in the polar fraction are flavonoids , phenolics and alkaloids. Semipolar fractions containing phenolic and alkaloids. While the non polar fractions containing alkaloids and phenolic compounds. The test result talked about refer that polar, semipolar, and non polar fraction of ethanol extract oaf sala leaves have cytotoxic activity against T47D cell.*

**Key words:** Cytotoxic assay, T47D cell, *Cynometra ramiflora*, fraction

## I. Pendahuluan

Produk alami dari tanaman memiliki peranan penting dalam pengembangan dan produksi obat baru terutama untuk terapi kanker (Rezai *et al.*, 2012). Pengembangan obat dari bahan alam sebagai alternatif pengobatan penyakit kanker dilakukan mengingat adanya keuntungan yaitu efek samping yang lebih sedikit dibanding obat konvensional, terjangkau, dan mudah didapat (Desai *et al.*, 2008; Mangan, 2003).

Penelitian mengenai senyawa kimia antikanker berbasis bahan alam telah dilakukan terhadap berbagai macam spesies tanaman. *Cynometra ramiflora* Linn. merupakan salah satu spesies tanaman yang berasal dari famili Fabaceae (Soerianegara & Lemmens, 1993) yang memiliki aktivitas sebagai antikanker pada beberapa sel kanker. Penelitian yang telah dilakukan secara *in vitro* menunjukkan ekstrak etanol daun tumbuhan sala memiliki aktivitas antikanker dengan IC<sub>50</sub> sebesar 1,9 µg/mL pada sel HeLa, sel T47D 0,41 µg/mL, dan 6,37 µg/mL terhadap sel WiDr (Indrayudha *et al.*, 2013). Sedangkan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanol kulit batang terhadap ketiga sel tersebut masing-masing sebesar > 100 µg/mL; 0,90 µg/mL; dan 6,29 µg/mL (Haryoto *et al.*, 2013).

Kanker payudara berasal dari kelenjar, saluran, dan jaringan penunjang payudara selain kulit (Mangan, 2003) yang tumbuh pada duktus dan menyebar pada jaringan stroma, membentuk jaringan ikat padat yang berklasifikasi disertai adanya peradangan (Tambunan, 1991). Sel T47D merupakan salah satu sel kanker payudara tipe sel epithelial (Anonim, 2013). Proliferasi sel T47D dipengaruhi oleh adanya p53. p53 merupakan protein supresor tumor yang berperan utama dalam menentukan stabilitas genetic dan proliferasi sel (Hurd *et al.*, 1995). Sel T47D dapat mengalami mutasi pada gen p53 ini yang disebabkan oleh hilangnya kendali pengaturan kerja protein p53. Sel yang mengekspresikan p53 yang tidak terkontrol telah kehilangan respon regulasi pertumbuhan normal ke protein, sehingga secara fungsional sel ini mirip dengan sel yang mengekspresikan protein mutan (Vojtesek and Lane, 1993).

Obat-obat antikanker ditujukan terutama dalam menghambat pertumbuhan maupun perkembangbiakan sel kanker. Molecular target obat antikanker pada sel kanker payudara diantaranya oestrogen reseptor (ER), HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*), dan *vascular endothelial growth factor* (VEG). Target pada induksi apoptosis dan inhibisi antiapoptosis yaitu melibatkan jalur p53-mitokondrial dan reseptor TRAIL, *nuclear*

*transcription factor, cell cycle progression, signal transduction* dan angiogenesis (Schlotter *et al.*, 2008)

Uji aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker dapat dilakukan salah satunya dengan metode MTT. Metode ini didasarkan pada pengukuran warna (*colorimetric*) yang terbentuk pada reaksi antara garam tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipenil tetrazolium bromida) dengan suksinat dehidrogenase mitokondria sel menghasilkan Kristal formazan berwarna ungu (Mosman, 1983). Absorbansi terhadap warna yang terbentuk pada 595 nm proporsional dengan jumlah sel hidup karena yang bereaksi dengan MTT adalah sel yang hidup. Uji ini banyak digunakan karena keunggulannya yang cepat, mudah, dan ekonomis serta akurat dan dapat dipercaya (*reliable*) dalam kuantifikasi jumlah sel (Silvester, 2011).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi polar, semipolar dan non polar ekstrak etanol daun tumbuhan sala terhadap sel T47D serta untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam masing-masing fraksi.

## **II. Metode**

### **Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun Sala, Etanol 96% *Pa*, n-Heksan *Pa*, etilasetat *Pa*, Silika G60, Silika Impreg, plate silica GF<sub>254</sub>, FeCl<sub>3</sub>, Dragendorf, anisaldehyd, sitroborat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> etanolik, Sel T47D, Aquabidestilata, Media kultur (RPMI 1600 ad 100%, 10% FBS (*Fetal Bovin serum*), 1% Fungizon dan 5% Antibiotik Penicillin-streptomisin), PBS (*Phosphat Buffered Salin*), tripsin-EDTA, DMSO, gas CO<sub>2</sub>, dan SDS 10%.

### **Peralatan**

Peralatan yang digunakan antara lain alat gelas, kolom fraksinasi, vakum, *rotary evaporator*, water bath, *Laminar Air Flow Cabinet*, Inkubator dengan CO<sub>2</sub>, Elisa Reader, mikroskop, mikroplat 96 sumuran, dan seperangkat alat KLT.

### **Optimasi fase gerak**

Fase gerak untuk fraksinasi ditentukan dengan melakukan pemisahan ekstrak dengan KLT. N-heksan dan etilasetat digunakan untuk mengelusi ekstrak dengan berbagai perbandingan dengan sifat kepolarannya yang semakin meningkat.

### **Fraksinasi**

Ekstrak etanol daun tumbuhan sala dibuat dengan maserasi sebanyak 1 kg simplisia kering daun tumbuhan sala dengan etanol 96%. Maserasi dilakukan satu kali dilanjutkan

dengan remaserasi sebanyak tiga kali. Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan *rotary evaporator* dilanjutkan dengan pengentalan diatas *water bath*. Ekstrak etanol sebanyak 25 gram yang diimpregnasi dengan silica impreg G60 (30-70 mesh) sebanyak 2 kali berat ekstrak dimasukkan dalam kolom KCV yang telah dijenuhkan dengan etanol 96%. Elusi dilakukan dengan pelarut dengan tingkat kepolaran semakin naik sesuai dengan hasil optimasi yang dilakukan sebelumnya. Tiap elusi ditampung sebanyak 200 mL dan ditotolkan pada plat silica untuk dilihat profil kromatografinya. Fraksi yang memiliki profil kromatografi yang mirip digabung sebagai satu fraksi. Penguapan pelarut dalam fraksi dilakukan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi yang kental.

### **Pembuatan Larutan Uji**

Sebanyak 10 mg fraksi yang ditimbang secara seksama dilarutkan dengan 100,00  $\mu\text{L}$  DMSO. Seri kadar larutan uji dibuat dari larutan stok pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$ , 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , 15,625  $\mu\text{g/mL}$ , dan 7,8125  $\mu\text{g/mL}$  dengan media kultur RPMI.

### **Uji Aktivitas Sitotoksik**

Sel T47D dengan kepadatan  $10^4$  diberi perlakuan fraksi dengan berbagai seri konsentrasi sebanyak 100  $\mu\text{L}$  tiap sumuran. Setelah inkubasi dengan  $\text{CO}_2$  selama 24 jam, media dibuang dan ditambah dengan MTT yang telah diencerkan dengan media kultur sebanyak 110  $\mu\text{L}$ . Kemudian sel kembali diinkubasi dalam incubator  $\text{CO}_2$  selama 4 jam. Pengujian ini dilakukan secara aseptis dalam *Laminar air flow* (LAF) Larutan SDS *stopper* ditambahkan pada tiap sumuran sebanyak 100  $\mu\text{L}$  setelah inkubasi selesai. Plate diinkubasi kembali ditempat gelap selama 24 jam. Warna yang terbentuk dibaca absorbansinya pada 595 nm dengan ELISA reader.

### **Penentuan $\text{IC}_{50}$**

% sel hidup dihitung dengan rumus tertentu dari absorbansi yang diperoleh. Perhitungan regresi linier antara log konsentrasi dengan % sel hidup menghasilkan persamaan linear  $Y=bX+a$ .  $\text{IC}_{50}$  diperoleh dengan mensubstitusi nilai 50 pada Y sehingga diperoleh X dan  $\text{IC}_{50}$  merupakan antilog dari X.

$$\text{Rumus perhitungan \% sel hidup: \% sel hidup} = \frac{(A-B)}{C-B} \times 100\%$$

A= absorbansi sel dengan perlakuan, B= absorbansi kontrol media, dan C= absorbansi kontrol sel

## Penentuan Senyawa yang Terkandung dalam Fraksi

Masing-masing larutan fraksi ditotolkan pada plat silica GF<sub>254</sub> dengan jarak pengembangan 5 cm. Kombinasi n-heksan dan etilasetat (7:3) digunakan sebagai fase gerak untuk memisahkan senyawa. Selanjutnya plat disemprot dengan reagen semprot dragendorff untuk deteksi alkaloid yang akan berwarna orange kecoklatan pada sinar tampak (Wagner *et al.*, 1984), FeCl<sub>3</sub> untuk deteksi senyawa fenolik dengan warna abu-abu sampai biru pada sinar tampak, anisaldehyd untuk deteksi senyawa terpenoid dengan warna biru-violet pada sinar tampak dan saponinyang terikat terpenoid dengan warna biru violet pada sinar tampak (Wagner *et al.*, 1984), dan sitroborat untuk deteksi senyawa flavonoid dengan flouresensi kuning-kuning hijau dibawah sinar UV 366 nm (Pramono, 1989 *cit* Sjahid, 2008).

## III. Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi simplisia daun tumbuhan sala dengan etanol 96% dilakukan untuk menarik senyawa yang terkandung dalam simplisia. Maserasi sebanyak satu kg simplisia kering daun tumbuhan sala menghasilkan ekstrak etanol sebanyak 161,1 gr dengan rendemen 16,11 %.

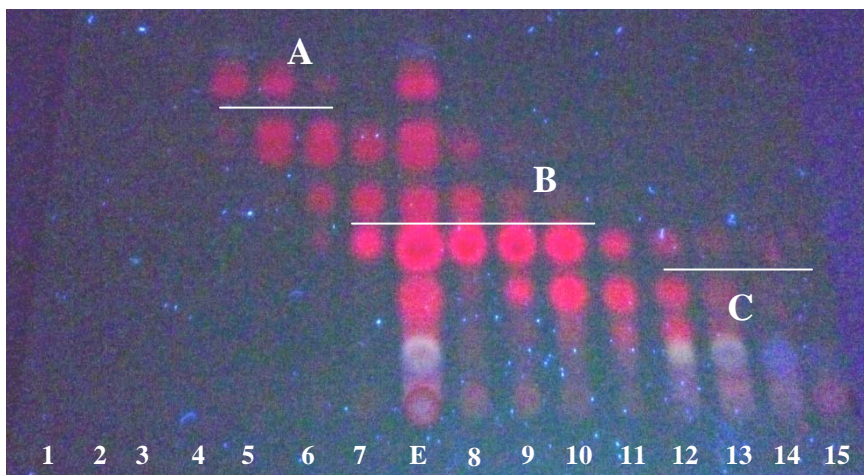
Fraksinasi sebanyak 50 gram ekstrak etanol daun sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) menggunakan fase gerak hasil optimasi yang tertera pada tabel 1.

**Tabel 1. Fase gerak yang digunakan dalam proses fraksinasi ekstrak etanol daun tumbuhan sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) dengan perbandingan dan banyaknya elusi.**

No. Elusi	Fase Gerak	Banyaknya Elusi
1	Heksan-Etilasetat (8:2)	2 kali
2	Heksan-Etilasetat (7,5:2,5)	2 kali
3	Heksan-Etilasetat (7:3)	3 kali
4	Heksan-Etilasetat (6:4)	3 kali
5	Heksan-Etilasetat (3:7)	3 kali
6	Etanol 96%	2 kali

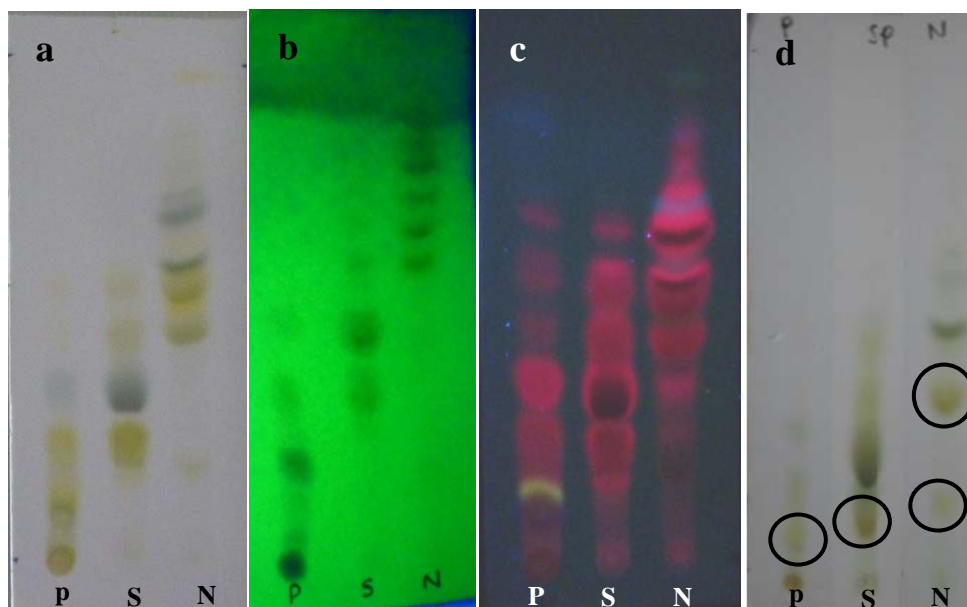
. Fraksinasi menghasilkan 15 tampungan yang masing-masing ditotolkan pada plat KLT untuk dilihat profil kromatografinya. Profil kromatografi kromatografi hasil fraksinasi yang ditunjukkan gambar 1 digunakan untuk pengelompokan fraksi. Dalam gambar terlihat fraksi 4-6 memilki profil yang mirip dan cenderung termasuk dalam senyawa-senyawa non polar, sehingga fraksi ini digabungkan sebagai fraksi non polar. Fraksi 7-11 memilki profil yang mirip dan berdasar kan kepolarannya cenderung masuk dalam golongan senyawa semi polar, sehingga fraksi-fraksi ini digabungkan sebagai fraksi semipolar. Selanjutnya fraksi 12-15 cenderung dalam golongan senyawa polar, sehingga fraksi-fraksi tersebut digabungkan sebagi

fraksi polar. Berat fraksi yang diperoleh setelah evaporasi pelarut untuk fraksi polar sebesar 1,47 g (2,94%), fraksi semipolar 1,1 g (2,2%), dan fraksi non polar 1,28 g (2,56%).



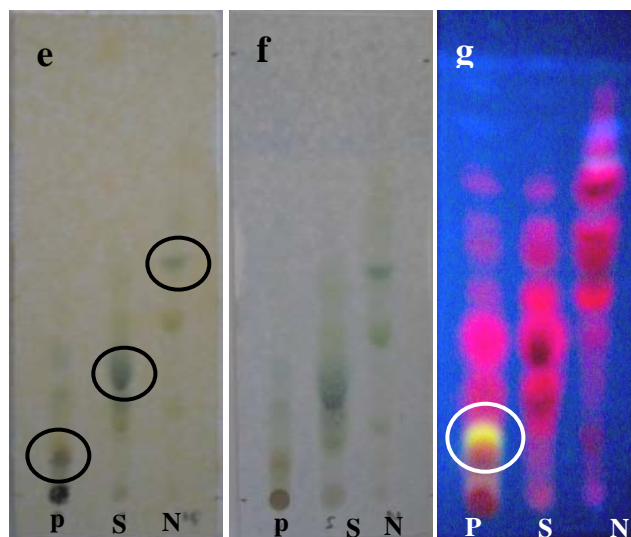
**Gambar 1.** Profil kromatografi hasil fraksinasi UV 366 (botol 1-15, E : ekstrak, A: non polar, B: semipolar, C: polar)

Identifikasi senyawa yang terkandung dalam fraksi memberikan hasil yang ditunjukkan pada tabel 2. Senyawa yang berhasil diidentifikasi dalam fraksi polar yaitu flavonoid, fenolik atau tannin, dan alkaloid. Senyawa yang teridentifikasi dalam fraksi semipolar yaitu senyawa golongan fenolik atau tannin dan alkaloid. Sedangkan dalam fraksi non polar terdapat senyawa fenolik atau tannin dan alkaloid.



**Gambar 2.** Profil kromatografi senyawa hasil KLT. Sebelum diberi pereaksi yang dilihat pada sinar tampak (a), UV 254 (b), dan UV 366 (c) dan profil kromatografi senyawa setelah disemprot dengan dragendorf-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (d).





Gambar 2. Deteksi senyawa dengan pereaksi FeCl<sub>3</sub> (e), anisaldehyd (f) yang diamati pada sinar tampak, dan sitroborat yang diamati pada UV 366 (g).

Tabel 2. Deteksi golongan senyawa dengan berbagai macam pereaksi semprot.

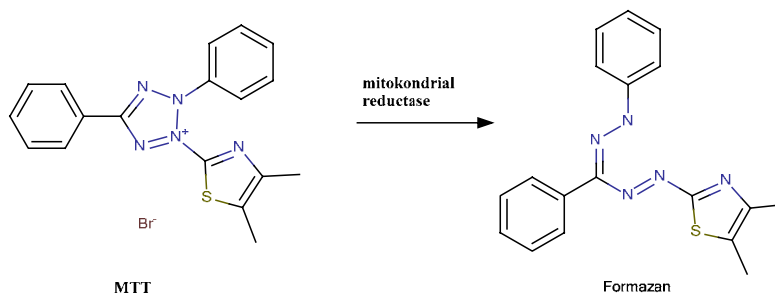
Fraksi	Bercak	Rf	Sebelum disemprot reagen		Dragendorff Sinar Tampak	FeCl <sub>3</sub> Sinar Tampak	Sitroborat UV 366	Anisaldehyd Sinar Tampak	Interpretasi
			UV 366	UV 254					
Polar	1	0,1	B	P	C	AB	K	C	Alkaloid, Flavonoid, Fenolik /tanin
	2	0,2	M	P	-	-	M	AB	
	3	0,34	M	P	-	-	M	-	
Semi polar	1	0,16	B	P	C	-	M	HM	Alkaloid
	2	0,22	M	P	-	-	M	HT	Fenolik /tannin
	3	0,3	M	P	-	AB	M	-	
	4	0,4	M	P	-	-	M	-	
	5	0,5	M	P	-	-	M	-	
Non Polar	1	0,26	M	P	C	-	M	-	Alkaloid
	2	0,38	M	P	C	-	M	HM	Alkaloid
	3	0,5	M	P	-	AB	M	HM	Fenolik/ tanin
	4	0,6	M	P	-	-	M	-	
	5	0,68	M	P	-	-	K	-	

B (Biru), M (Merah), P (Putih), C (Coklat), AB (Abu-abu), K (Kuning), HM (Hijau Muda), HT (Hijau Tua).

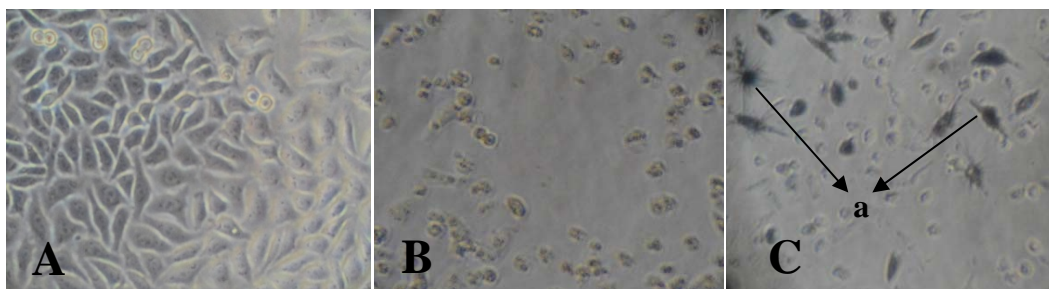
Beberapa tumbuhan dengan genus yang sama biasanya memiliki kandungan senyawa kimia yang sama. Senyawa kimia yang terkandung dalam daun *Cynometra iripa* Kostel. antara lain polifenol, tannin, saponin, dan flavonoid dengan konsentrasi paling tinggi (Desai dan Cavan, 2010) serta karotenoid, klorofil, dan protein (Basak *et al.*, 1996).

Uji sitotoksik fraksi polar, semipolar dan non polar terhadap sel T47D dilakukan dengan metode kolorimetri MTT *assay*. Sel yang masih hidup setelah pemberian ekstrak

dikuantifikasi menggunakan MTT yang membentuk kristal formazan akibat reaksi dengan mitokondrial reduktase. Kristal formazan (Gambar 2) ini bersifat basa yang tidak larut dalam air. Dengan penambahan SDS 10% dalam HCL, kristal formazan membentuk garam yang dapat larut, sehingga warna yang dihasilkan dapat diukur absorbansinya dengan ELISA reader.



**Gambar 2. Reaksi pembentukan Kristal formazan.**



**Gambar 4. Sel T47D normal tanpa perlakuan (A), Sel T47D setelah perlakuan dengan fraksi (B) terlihat mengalami kerusakan. Perlakuan sel T47D dengan MTT (C) menghasilkan kristal formazan (a).**

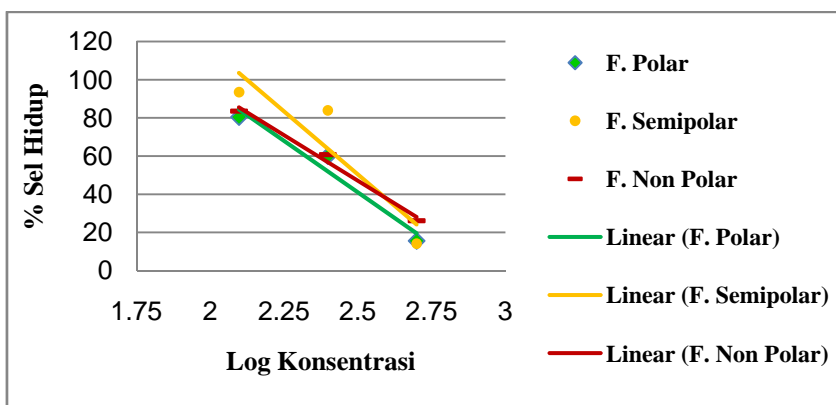
**Tabel 3. % sel hidup dan IC<sub>50</sub>.**

Fraksi	K (µg/mL)	Log K	Sel Hidup (%)			Persamaan Regresi Linier	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
			R 1	R 2	Rata-rata		
Polar	500	2,69897	14,0719	17,1555	15,6137	Y = -107,733 X + 310,355 R <sup>2</sup> = 0,9569	260,02
	250	2,39794	52,9848	66,9433	59,9641		
	125	2,09691	76,2923	84,6584	80,4754		
Semi Polar	500	2,69897	10,1369	18,1994	14,1682	Y = -131,829 X + 380,007 R <sup>2</sup> = 0,83904	318,64
	250	2,39794	80,8663	87,0486	83,9575		
	125	2,09691	93,4786	93,5962	93,5374		
Non Polar	500	2,69897	24,4307	27,8464	26,1386	Y = -95,406 X + 285,602 R <sup>2</sup> = 0,9861	294,76
	250	2,39794	63,6801	57,8348	60,7575		
	125	2,09691	81,5726	85,5847	83,5786		

**K= Konsentrasi, R= Replikasi**

Tabel 3 menunjukkan hasil uji aktivitas sitotoksik. Regresi linier antara log konsentrasi fraksi dengan % sel hidup menghasilkan persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier yang diperoleh dari perlakuan dengan menggunakan fraksi polar adalah Y= -107,733 X +

310,355 ( $R^2 = 0,9569$ ), fraksi semipolar  $Y = -131,829 X + 380,007$  ( $R^2 = 0,83904$ ), sedangkan fraksi non polar adalah  $Y = -95,406 X + 285,602$  ( $R^2 = 0,9861$ ). Dari persamaan tersebut dapat diketahui nilai IC<sub>50</sub> masing masing fraksi adalah sebesar 260,02 µg/mL, 318,64 µg/mL, dan 294,76 µg/mL.



Gambar 5. Grafik hubungan Log Konsentrasi dengan % sel hidup setelah perlakuan dengan fraksi

Sel T47D yang diberi perlakuan dengan ketiga fraksi menunjukkan jumlah sel hidup yang semakin kecil dengan meningkatnya konsentrasi. IC<sub>50</sub> atau Inhibitory concentration 50 yang merupakan konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan sel sebanyak 50% yang terkecil ditunjukkan oleh fraksi polar, kemudian fraksi non polar dan yang terbesar ditunjukkan oleh fraksi semipolar. Berdasarkan hal tersebut, aktifitas sitotoksik fraksi polar tertinggi diberikan oleh fraksi polar, sedangkan fraksi non polar memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dari pada fraksi semipolar. Menurut Maryati & Sutrisna (2007), suatu senyawa berpotensi sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker apabila memiliki nilai IC<sub>50</sub> yang kurang dari 100 µg/mL. IC<sub>50</sub> yang diperoleh tersebut menunjukkan bahwa ketiga fraksi memiliki aktivitas sitotoksik yang rendah atau kurang berpotensi sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker T47D.

Kandungan senyawa dalam fraksi polar hasil identifikasi antara lain flavonoid, fenolik, dan alkaloid yang memiliki aktivitas antikanker. Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan senyawa flavonoid mampu menghambat pertumbuhan kanker melalui mekanisme inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, pemutusan siklus sel, induksi apoptosis dan diferensiasi, dan penghambatan angiogenesis (Ren *et al.*, 2003). Adanya senyawa polifenol dan alkaloid

dalam fraksi juga berkontribusi dalam menghasilkan efek sitotoksik terhadap sel kanker T47D (Wahle et al., 2009 dan Lu et al., 2012)

Fraksi non polar memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi dari pada fraksi semipolar. Senyawa fenolik dan alkaloid teridentifikasi dalam fraksi semipolar dan non polar. Pemisahan yang kurang sempurna dalam fraksinasi menyebabkan adanya kesamaan senyawa dalam kedua fraksi tersebut.

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun tumbuhan sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D. Sedangkan fraksinasi terhadap ekstrak etanol daun tumbuhan sala memberikan hasil yang lebih rendah. Dewick (1987) menjelaskan perbedaan aktifitas antara ekstrak dengan fraksi dapat terjadi dalam suatu uji sitotoksik. Hal tersebut dapat disebabkan oleh aktifitas terapeutik total ekstrak yang lebih besar dibandingkan dengan secara individual. Adanya efek sinergisme atau antagonisme karena sifat senyawa dalam ekstrak yang kompleks mungkin menjadi penyebab hal tersebut. Penelitian oleh Machana *et al.* (2012) membuktikan bahwa adanya efek sinergisme antar senyawa dalam ekstrak etanol-air daun *Polyalthia evecta* dengan sitotoksitas dan induksi apoptosis yang lebih tinggi. Senyawa dalam fraksi heksan yang dikombinasi dengan fraksi air juga memberikan efek sitotoksik dan induksi apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan pada perlakuan dengan fraksi heksan atau air secara individual. Selain hal tersebut kemungkinan perbedaan aktivitas dapat disebabkan oleh adanya *plausible effect*, *complementary effect*, dan *hidden antagonism*.

Senyawa lain yang terdapat dalam fraksi adalah senyawa klorofil. Klorofil terdapat dalam semua tanaman yang berwarna hijau, termasuk tumbuhan sala. klorofil tersebut dapat dihilangkan dari fraksi dengan pemisahan menggunakan kolom sefads (Lam *et al.*, 1984) atau dengan air panas. Namun senyawa ini diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker (El-Sayed *et al.*, 2013). Turunan klorofil dapat membunuh 50% sel MCF7 dengan konsentrasi 138 kali lebih kecil dari metotreksat. Turunan klorofil menunjukkan efikasi yang tinggi dalam membunuh sel tumor dan aman bagi sel normal (Gomaa, 2012). *Pheophorbide* merupakan turunan klorofil yang mampu menginduksi apoptosis dengan kombinasi PDT (*Photodynamic Therapy*) melalui jalur caspase-dependen dengan terjadi peningkatan protein penekan tumor p53, pemecahan caspase-9 dan *poly(ADP-ribose) polymerase* (Hoi *et al.*, 2012)

#### IV. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa fraksi polar, semipolar dan non polar ekstrak etanol daun tumbuhan sala memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan IC<sub>50</sub> masing-masing fraksi sebesar 260,02 µg/mL, 318,64 µg/mL, dan 294,76 µg/mL. Senyawa yang berhasil dideteksi dalam fraksi polar antara lain alkaloid, fenolik, dan flavonoid. Sedangkan dalam fraksi semipolar antara lain alkaloid dan fenolik, dan senyawa yang berhasil dideteksi pada fraksi non polar antara lain alkaloid dan fenolik.

#### V. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan fraksinasi menggunakan pelarut dan metode lain terhadap ekstrak etanol daun tumbuhan sala serta uji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker. Identifikasi lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak maupun fraksi.

#### VI. Ucapan Terimakasih

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga peneliti dapat menyelesaikan penelitian ini. Peneliti mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang telah membantu peneliti demi kelancaran dalam melaksanakan penelitian dari awal sampai akhir.

#### VII. Daftar Pustaka

- Anonim, 2013, T-47D, <http://www.atcc.org/~ps/HTB-133.ashx> (diakses tanggal 23 April 2013)
- Basak, U. C., Das, A. B., dan Das, P., 1996, Chlorophyll, carotenoid, proteins, and secondary metabolites in leaves of 14 species of mangroves, *Bull. Mar. Sci.* 58 : 654-659
- Desai, A. G., Qazi, G. N., Ganju, R. K., El-Tamer, M., Singh, J., Saxena, A. K., *et al.*, 2008, Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention, *Bentham Science Publiser*, 9 (11), 581-591
- Desai, Mrunalini N., dan Chavan, N. S., 2010, Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Cynometra iripa* Kostel., *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.
- Dewick, P. M., 1987, Tumor Inhibitor From Plants, in George Eduward Trease & William Charles Evans (eds.), *Pharmacognosy 12<sup>th</sup> Edition*, 631, ELBS (English Language Book Society) published ©Bailliere Tindal, 33 the Avenue, Eastbourne.
- El-Sayed, W. M., Hussin, W. A., Mahmoud A. A., AlFredan, M. A., 2013, The *Conyza triloba* Extracts With High Chlorophyl Content And Free Radical Scavenging Activity

- Had Anticancer Activity in Cell Lines, *Hindawi Publishinng Corporation*, 2013: 1-12.
- Gomaa, I., Ali, S. E., El-Tayeb, T. A., Abdel-kader, M. H., 2012, Chlorophyll derivative mediatedPDT Versus Methotrexate: An In Vitro Study Using MCF-7 Cells, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9 (4): 362-368
- Haryoto, Andi S., Tanti A., Muhtadi, & Peni I., 2013, *Cytotoxic Effects of Ethanol Extract From The Cynometra ramiflora Linn. Stem Bark on Cancer Cell Lines*, International Conference of Natural Product (ICNP 2013), UiTM, Malaysia.
- Hoi, S. W., Wong, H. M., Chan, J. Y., Yue, G. G., Tse, G. M., Law, B. K., *et al.*, 2012, Photodynamic Therapy of Phephorbide A Inhibits The Proliferation of Human Breast Tumor Via Both Caspase-dependent and –independent Apoptosis Pathways In In Vitro And In Vivo Models, *Phytotherapy Research*, 26 (5): 734-742.
- Hurd, C., Nidhi, K., Alban, P., Nag, K., Jhanwar, S. C., Dinda, S., *et al.*, 1995, Hormonal Suppressor Protein in T47D Human Breast Carcinoma Cell Line, *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (48): 28507-28510.
- Indrayuda, P., Haryoto, Muhtadi, & Tanti A., 2013, *Cytotoxic Effect of Ethanol Extract from Cynometra ramiflora Linn. Leaves on T47D, HeLa, and WiDr Cancer Cell Lines*, International Conference of Natural Product (ICNP 2013), UiTM, Malaysia.
- Lam E., Oritz, W., Mayfield, S., & Malkin, R., 1984, Isolation And Characterization of A Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein Complex Associated With Photosystem I, *Plant Physiology*, 74 (3), 650-655.
- Lu, J., Bao, J., Chen, X., Huang, M., & Wang, Y., 2012, Review Article Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-12.
- Machana, S., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Thumanu, K., & Tanthanuch, W., 2012, Synergistic Anticancer Effect of The Extracts From Polyalthia evecata Caused Apoptosis In Human Hepatoma (HepG2) Cells, *Asian Pac J Trop Biomed*, 2 (8): 589-596.
- Mangan, Yellia, 2003, *Cara Bijak Menaklikkan Kanker*, penerbit PT AgroMedia Pustaka, Tangerang, hal. 31-32.
- Maryati & Sutrisna, EM., 2007, Potensi Sitotoksik Tanaman Ceplukan (*Physalis angulata* L) Terhadap Sel HeLa, *Pharmacon*, 8 (1), 1-6.
- Mosman, 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxic Assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L., 2003, Flavonoids: Promising Anticancer Agents, *Medicinal Research Reviews*, 23 (4): 519-534.
- Rezaei, P. F., Fouladdel, S., Ghaffari, S. M., Amin, G., & Azizi, E., 2012, Induction of G1 Cell Cycle Arrest and Cyclin D1 Down-Regulation in Response to Pericarp Extract of Baneh in Human Breast Cancer T47D Cells, *DARU Journal of Pharmaceutical Science*, 20 (101), 1
- Schlotter, C. M., Vogt, U., Allgayer, H., & Brandt, B., 2008, Molecular Targeted Therapies for Breast Cancer Treatment, *Breast Cancer Research*, 10(211): 1-12.
- Sjahid, L. R., 2008, Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.), *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Soerianegara, I. & R. H. M. J. Lemmens, eds. 1993. Timber trees: Major commercial timbers. In: *Plant Resources of South-East Asia. Prosea* 5(1): 155.
- Sylvester, PW., 2011, Optimazion of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability, *Methods Mol Biol*, 716: 157-168.
- Tambunan, Gani W., 1991, *Diagnosis dan Tatalaksana 10 Jenis Kanker Terbanyak Di Indonesia*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 26-27
- Vojtesek, B., & Lane, D. L., 1993, Regulation Of p53 Protein Expression In Human Breast Cancer Cell Lines, *Journal of Cell Science*, 105, 607-612.
- Wagner H., Bladt S., & Zgainski E. M., 1984, *Plant Drug Analysis "A Thin Layer Chromatography Atlas"*, New York, Berlin Heidelberg.
- Wahle, K. W. J., Rotondo, D., Brown, I., & Heys, S. D., 2009, Plant Phenolics in Prevention and Treatment of Cancer, In: Maria Teresa Giardi, Giuseppina Rea and Bruno Berra, *Boi-Farms for Nutrceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, UK, Lades Bioscience and Springer Science+Bussiness Media.